

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-253230
(43)Date of publication of application : 10.09.2002

(51)Int.Cl. C12N 15/02
C07K 1/22
C07K 16/38
C12N 5/10
C12P 21/08
G01N 33/53
G01N 33/577

(21)Application number : 2001-059444 (71)Applicant : DAICHI KASEI:KK
(22)Date of filing : 05.03.2001 (72)Inventor : NARITA HIROSHI
KINEKAWA YOICHI

(54) MONOCLONAL ANTIBODY, HYBRIDOMA AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To evaluate a thermally denatured degree and enable to determine ovomucoid, and enable identification and precise determination of egg allergen.

SOLUTION: This monoclonal antibody recognizes ovomucoid and reacts with undenatured ovomucoid, but does not react with thermally denatured ovomucoid or reacts with thermally denatured ovomucoid, but does not react with undenatured ovomucoid or reacts with undenatured ovomucoid and thermally denatured ovomucoid. A hybridoma group produces the monoclonal antibody.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-253230

(P2002-253230A)

(43)公開日 平成14年9月10日(2002.9.10)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト ⁸ (参考)
C 12 N 15/02		C 07 K 1/22	4 B 0 2 4
C 07 K 1/22		16/38	4 B 0 6 4
16/38		C 12 P 21/08	4 B 0 6 5
C 12 N 5/10		G 01 N 33/53	D 4 H 0 4 5
C 12 P 21/08		33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-59444(P2001-59444)

(22)出願日 平成13年3月5日(2001.3.5)

(71)出願人 591054602

株式会社第一化成

京都府京都市山科区川田岡ノ西町7番地の
1

(72)発明者 成田 宏史

京都府宇治市広野町丸山5-11

(72)発明者 杵川 洋一

滋賀県蒲生郡安土町宮津83-14

(74)代理人 100068032

弁理士 武石 靖彦 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体、ハイブリドーマおよびその用途

(57)【要約】

【課題】 加熱変性状態をも識別してオボムコイドを定量し、卵アレルゲンの同定と正確な定量を可能とすることを課題とする。

【解決手段】 オボムコイドを認識するモノクローナル抗体で、未変性オボムコイドと反応するが熱変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、熱変性オボムコイドと反応するが未変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、及び未変性オボムコイドと熱変性オボムコイドに反応するモノクローナル抗体、およびこれらを產生するハイブリドーマ群を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】オボムコイドを認識するモノクローナル抗体であって、未変性オボムコイドと反応するが熱変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、熱変性オボムコイドと反応するが未変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、未変性オボムコイドと熱変性オボムコイドに反応するモノクローナル抗体、およびこれらを產生するハイブリドーマ群。

【請求項2】未変性および熱変性オボムコイドに対する抗体を產生しうるマウスまたはラット脾臓細胞とマウスまたはラットミエローマ細胞を融合させてハイブリドーマとし、このハイブリドーマを培養することにより請求項1のモノクローナル抗体群を製造する方法。

【請求項3】請求項2の方法を用いて製造したオボムコイドを認識するモノクローナル抗体であって、(a) 未変性オボムコイドと反応するが熱変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、(b) 熱変性オボムコイドと反応するが未変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、(c) 未変性オボムコイドと熱変性オボムコイドに反応するモノクローナル抗体、を用いるオボムコイドの免疫学的定量方法。

【請求項4】請求項2の方法を用いて製造したオボムコイドを認識するモノクローナル抗体であって、(a) 未変性オボムコイドと反応するが熱変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、(b) 熱変性オボムコイドと反応するが未変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、(c) 未変性オボムコイドと熱変性オボムコイドに反応するモノクローナル抗体、を用いるオボムコイドを除去した卵白タンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、鶏卵白オボムコイドの熱変性状態を識別可能なモノクローナル抗体群とそれらを產生するハイブリドーマ群、およびそれらの製造方法と用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】現在では三人に一人、すなわち一家に一人は何らかのアレルギー疾患を持つと言われている。なかでも食物アレルギーは、食品が生命の維持・成長を大きく左右する乳幼児を中心に高い頻度で発症すること、一旦感作が成立するとアレルギーマーチと言われるように気管支喘息などへの移行が起こることから、一層深刻な問題となっている。アレルゲンを含む主たる食品として、卵、牛乳、大豆、米、小麦などが挙げられるが、乳幼児で最も頻度が高いのは卵アレルギーである（厚生省食物アレルギー対策検討委員会平成11年度報告書）。卵アレルゲンとしてはオボアルブミン、オボトランスフェリン、オボムコイドが挙げられる。中でもオボムコイドはその熱安定性や消化酵素に対する耐性から最も強力なアレルゲンと考えられている。アレルギー治療の基本は

アレルゲンを摂取しないことである。従って、アレルゲンの同定と正確な定量、その除去が重要な課題となっている。

【0003】オボムコイドの同定、定量に関してはすでにポリクローナル抗体を用いた方法 (Int. Archs. Allergy appl. Immun., 75, 8-15, 1984) あるいはモノクローナル抗体を用いた方法 (J. Nutr. Sci. Vitaminol. 45, 491-500, 1999) が公知である。これらはいずれもオボムコイドを未変性単一状態と見なしている。しかしながら、現実に我々が食するのはほとんどの場合加熱処理されたタンパク質（オボムコイド）であり、アレルゲン性を問題にする以上、食物中におけるアレルゲンの存在状態を考慮した方法を探らなければならないが、このような方法は、まだ開発されていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、未変性オボムコイド、熱変性オボムコイド、両者共に認識するモノクローナル抗体を作製し、これらを用いて、加熱変性状態を識別してオボムコイドを定量する方法を確立することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】低アレルゲン化あるいはアレルギー診断試薬の調製目的とした脱オボムコイド法には、一般タンパク質の精製同様、クロマトグラフィーにより取り除く方法、加熱法 (J. Allergy Clin. Immunol., 100, 171-176, 1997)、エチルアルコール法 (Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2005-2007, 2000) が知られているが操作が煩雑である、製品の物性に影響を与える、オボムコイドの完全な除去が困難であるなどの欠点があるが、モノクローナル抗体結合担体を用いればこれらの問題点を克服したオボムコイド除去法の開発が可能であることを見い出し、本発明は完成された。

【0006】すなわち、本発明は、オボムコイドを認識するモノクローナル抗体であって、未変性オボムコイドと反応するが熱変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体 (OM1H1A, OM10D3F)、熱変性オボムコイドと反応するが未変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体 (OM6H11D)、未変性オボムコイドと熱変性オボムコイドに反応するモノクローナル抗体 (OM7D3F, OM8C3C)、およびこれらを產生するハイブリドーマ群を提供する。

【0007】かかる本発明によれば、オボムコイドの熱変性状態を識別しうる抗体および該抗体を用いた簡便かつ高感度なオボムコイド免疫測定法並びにオボムコイドの除去法が提供できる。

【0008】本発明のオボムコイドの熱変性状態を識別可能モノクローナル抗体は、以下に示すようにすでに確立されている方法により得ることができる。即ち、未変性、熱変性オボムコイドの10-100 μg を完全フロイントアジュバントなどとの懸濁液としてマウスあるいはラッ

トに腹腔内投与する。不完全フロイントアジュバントを用いて2~4週間ごとに1~数回追加免疫を行った後、最終免疫の3~4日後に脾臓を摘出し、その脾臓細胞とミエローマ（骨髄腫）細胞を融合させ、ハイブリドーマを得る。ミエローマ細胞として、マウスではSP-2、NS-1、P3-U1、ラットではY3.Ag1.2.3などが使用される。ハイブリドーマは、前記の細胞融合処理後の細胞を通常のハイブリドーマ選択培地（HAT培地：ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含む培地）で培養することによって得られる。

【0009】脾臓細胞はHAT培地中では増殖不可能であり、ミエローマ細胞はヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスクレラーゼ（HGPRT）欠損株であるためアミノブテリンを含むHAT培地中では生育できない。従って、脾臓細胞からのHGPRT遺伝子を導入され、HAT培地で生育できた細胞がハイブリドーマである。目的とする抗体を産生するハイブリドーマを酵素免疫測定法（ELISA）により選択後、限界希釈により単一クローニングを行い、増殖および抗体産生能において安定した株を確立する。

【0010】このようにして得られた本発明のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、通常の培地で継代培養でき、液体窒素中で容易に長期保存が可能である。なお、抗体の精製は、硫酸アンモニウムなどによる塩析、ジエチル・アミノ・エチル・セルロースなどを用いるイオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルfiltration、アフィニティー・クロマトグラフィーなどの一般的なタンパク質の単離・精製方法を用いて行われる。

【0011】本発明のオボムコイドに結合する抗体を用いたオボムコイドの測定には、例えば「酵素免疫測定法」（第2版、石川英治他著、医学書院、1982年）などに記載されている公知の方法を用いることができる。ここでは酵素免疫測定法（ELISA）に基づくサンドイッチ法について簡単に説明する。なお、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、放射線免疫測定法もELISAと同様な原理によるものである。

【0012】サンドイッチELISA法は、抗原を特異性の異なる2種の抗体に挟み込む方法で、一次抗体（固相化抗体）と抗原（標準または検体）とを反応させたのち、これに酵素標識した二次抗体を結合させる。従って酵素活性は二つの特異抗体に挟まれた抗原量を反映することになる。検体中の抗原量は、既知濃度の標準遊離抗原を用いて作成した検量線から算出することができる。

【0013】抗体を標識する酵素としては、ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリフェヌラーゼ、グルコースオキシダーゼなどがあり、これらの酵素を「エンザイムイムノアッセイ」（生化学実験法1、石川栄治監訳、東京化学同人、1989年）「超高感度酵素免疫測定法」（石川栄治著、学会出版センター、1993年）等に記載されている方法で抗体に標識

することができる。また感度をあげるためにAvidin Biotinylated enzyme Complex (ABC)法、Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)法なども使用される。一方、固相の支持体としては、シリコン、ナイロン、プラスチック、ビーズ、マイクロプレートもしくは試験管などが使用される。

【0014】一方、オボムコイド除去に用いられる該モノクローナル抗体結合担体の作製およびこれを用いたオボムコイドの除去に関しては「Antibodies」（Harlow & Lane編集、Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）などに記載されている公知の方法を用いることができる。

【0015】

【実施例】以下、本発明を実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。実施例1

オボムコイドに結合するモノクローナル抗体の作製

(1) 抗原の調製

新鮮鶏卵より調製した水溶性卵白50mlを0.1M酢酸緩衝液（pH3.8）50mlと混合した。得られた卵白希釈液を0.1M酢酸緩衝液（pH3.8）に対して透析後、6000×g、15分、4°Cにて遠心し、上清を回収後0.02%NaN₃を入れ、4°Cで保存し卵白液（タンパク質量は40mg/ml）とした。

【0016】200mlの0.1M酢酸緩衝液（pH3.8）で平衡化した40mlのカルボキシメチル基親水性ビニルポリマー（CMトヨバル650M、東ソー社製）に(1)で得られた卵白液5mlと0.1M酢酸緩衝液（pH3.8）20mlをよく混合した液をアブライした。0.1M酢酸緩衝液（pH3.8）でカラムを洗浄後、0.1M酢酸緩衝液（pH4.3）200mlでオボムコイドを溶出した。回収したオボムコイドは16mgであり、リン酸緩衝液（150mM 塩化ナトリウムを含むリン酸濃度10mMの緩衝液、pH7.4、以下PBSと略す）に透析後未変性オボムコイドとして以下の実験に供した。また、熱変性オボムコイドは1mg/mlのオボムコイドPBS溶液を100°Cで1時間加熱処理する事により作製した。

【0017】(2) 免疫脾臓細胞の調製

6~8週令の雌BALB/cマウスの腹腔内に抗原として未変性あるいは熱変性したオボムコイド100μgと完全フロイントアジュバント（Freund's complete adjuvant、Difco社製）とのエマルジョン（1容：1容）を投与した。2週間後、上述抗原50μgと不完全フロイントアジュバント（Freund's incomplete adjuvant、Difco社製）とのエマルジョン（1容：1容）を腹腔内に投与し、さらに2週間後抗原50μgを含むPBSを腹腔内に投与した。その後3日後にマウスを屠殺し、脾臓を摘出してこれをほぐし、基本培地（GIBCO社製のL-グルタミン0.3g/l、25mMヘペス含有 RPMI-1640培地にビルビン酸ナトリウム0.11g/l、炭酸水素ナトリウム2g/l、結晶ベニシリンGカリウム1万単位/l、ストレプトマイシン10mg/l

5

を加えた培地)に懸濁した後、脾臓細胞を遠心分離で回収した。

【0018】(3) 細胞融合とHAT 選択

(2) で調製した脾臓細胞と10%ウシ胎仔血清を添加した基本培地(以下、血清添加培地と記す)で培養した対数増殖期のマウスマイエローマ細胞NS-1を5:1の比率になるように混合し、基本培地で2回洗浄した。遠心分離により細胞を回収し、細胞ペレットに平均分子量1500の50%ポリエチレングリコール溶液(ベーリングガーマンハイム山之内製薬)1mlを1分間かけて添加し、その後11分間静置した。さらに20mlの基本培地を10分間かけて添加し、細胞液を希釈した後、遠心分離により細胞を回収した。この細胞を40mlのHAT培地(4×10-7Mアミノブテリン、1.6×10-5Mチミジン、および1×10-4Mヒボキサンチンを含む血清添加培地)に懸濁し、96穴プレート4枚に分注し、湿度100%、炭酸ガス5%、37°Cで培養を開始した。培養開始の翌日、HAT培地を各ウェルに100μl添加し、以後2ないし3日ごとに半量の培地を新たなHAT培地と交換し、培養を続けた。その結果、ほとんどすべてのウェルでハイブリドーマの増殖が認められた。

【0019】(4) 抗体産生ハイブリドーマの取得

未変性あるいは熱変性したオボムコイドに結合する抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングはELISAにより行った。2μg/mlのオボムコイドを50μlずつELISA用96穴プレートに加え、37°Cで1時間吸着させた後、プレートをPBSで3回洗浄した。各ウェルに1%牛血清アルブミンを含むPBS溶液(以下BSA-PBSと記す)を200μl添加し、37°Cで1時間吸着させ、タンパク質の非特異的吸着がおこらないように各ウェルを完全にプロックし、さらにプレートをトリス-塩酸緩衝液(150mM塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液pH7.4、以下TBSと略す)で3回洗浄した。各ウェルに前記(3)で得られたハイブリドーマの培養上清50μlを添加し、37°Cで1時間抗原抗体反応を行った。このプレートをTBSで1回、0.05%ツイーン20(Bio-Rad社製、ELISA grade)含有TBS(以下、Tween20-TBSと記す)で5回、さらにTBSで1回洗浄し、未反応の抗体を除去した。

【0020】次に、各ウェルにTween20-TBSで1000倍に希釈したアルカリフィオスファターゼ標識抗マウス免疫グロブリンG抗血清(カッペル社)を50μl添加し、37°Cで1時間反応させ、PBSで1回、Tween20-TBSで5回、TBSで1回洗浄し、ついで各ウェルに基質であるp-ニトロフェニルリン酸を1mg/ml含むジエタノールアミン緩衝液(10%ジエタノールアミン、0.5mM MgCl₂、pH9.8)を100μl添加し、室温で1時間から数時間反応させ、マイクロプレートリーダー(Model 3550、Bio-Rad社製)を用いて反応液の405nmにおける吸光度を測定し、固相抗原と結合した抗体を検出した。その結果未変性オボムコイドで陽性な5ウェルと熱変性オボムコイドで陽

性な1ウェルが見つかった。

【0021】(5) ハイブリドーマのクローニング

抗体産生陽性ウェル6個中の細胞を、限界希釈法によりクローニングを行った。増殖培地として血清添加培地に増殖因子としてオライジョン(IGEN社製のB細胞増殖因子を含む溶液)を10%になるように添加したもの用いた。なお抗体産生細胞のスクリーニングは上記(4)と同様のELISAを行い、陽性クローニングを再度クローニングすることにより、未変性オボムコイド固相に結合するモノクローナル抗体を産生する5種の細胞株1H1A、2H12D、7D3F、8C3C、10D3Fと熱変性オボムコイド固相に結合するモノクローナル抗体産生株6H11Dを樹立した。

【0022】(6) モノクローナル抗体の免疫グロブリンのサブクラスの決定

モノクローナル抗体産生細胞株が培養上清液中に分泌するモノクローナル抗体について、その免疫グロブリンのサブクラスを、マウスマノクローナル抗体アイソタイピングキット(アマーシャムファルマシアバイオテク社製)を用いて調べた。モノクローナル抗体はすべてIgG1であり、軽鎖はκであった。

【0023】(7) マウスマノクローナル抗体の精製

BALB/cマウスに腹水癌を誘導するために0.5mlのプリスタンを腹腔内投与し、投与3~10日後に前記(5)で得られた1×10⁷個のモノクローナル抗体産生細胞を腹腔内に移植した。約2週間後に腹水を採取し、50%飽和硫酸アンモニウム塩析により粗モノクローナル抗体を得た。この粗抗体はさらにプロテインAセファロース(アマーシャム・ファルマシア・バイオテク社製)を用いて純化し、PBSに対して透析後、4°Cで保存した。腹水1mlあたり約5mgの精製抗体(モノクローナル抗体OM1H1A、OM2H12D、OM7D3F、OM8C3C、OM10D3F、OM6H11D)を得た。

【0024】実施例2

オボムコイドに結合するモノクローナル抗体の特性決定実施例1で得られたモノクローナル抗体のオボムコイドに対する結合特性の解析のために競合ELISAを行った。競合ELISAは、ELISAにおける特異抗体と固相化抗原との結合が遊離抗原を共存させることにより、容量依存的に阻害される事を利用したもので、その阻害の程度によって抗体の抗原への結合親和性を明らかにできる。

【0025】実施例1の(4)同様、未変性オボムコイドを固相化、プロッキングした各ウェルに前記(7)で得られたモノクローナル抗体(OM1H1A、OM2H12D、OM7D3F、OM8C3C、OM10D3F、OM6H11D)200ng/mlを50μlと未変性あるいは熱変性オボムコイド0、0.01、0.1、1、10、100、1000μg/mlを50μlずつ添加し、37°Cで1時間抗原抗体反応を行った。このプレートはその後実施例1の

(4)同様の処理され、アルカリホスファターゼ反応に供された。その結果を図1~3に示す。また、変性オボムコイドを固相化したプレートを用いて、モノクローナ

ル抗体 OM6H11Dに対しても同様の競合ELISAを行った。その結果を図4に示す。

【0026】モノクローナル抗体OM1H1Aは未変性オボムコイドで強く阻害されたことから未変性オボムコイドを特異的に認識している事が判明した(図1)。モノクローナル抗体 OM10D3FもOM1H1Aと同様の性質を示した。モノクローナル抗体 OM2H12Dは遊離の変性、未変性どちらでも阻害されず、固相化に伴う疎水変性オボムコイドを特異的に認識していると思われた(図2)。モノクローナル抗体 OM7D3Fは変性、未変性オボムコイドによりほぼ同程度阻害された事から熱変性を起こさない部位を認識することが判明した(図3)。モノクローナル抗体 OM8C3CもOM7D3Fと同様の性質を示した。一方、モノクローナル抗体 OM6H11DはOM1H1AやOM10D3Fとは逆で、変性オボムコイドで強く阻害されたことから変性オボムコイドを特異的に認識している事が判明した(図4)。また、図1~4に表される阻害曲線を検量線として用いることにより、未変性、熱変性、総オボムコイドの定量がそれぞれ可能である。

【0027】実施例3

サンドイッチELISAによる熱変性状態の異なるオボムコイドの高感度定量

実施例2で、オボムコイドの熱変性状態を識別可能なモノクローナル抗体群を用いた競合ELISAによって、熱変性、未変性及び総オボムコイドの定量が可能であることが明らかとなった。しかしながら、競合ELISAは共存物質の影響を受けやすく、感度も低いため、アビジン-ビオチン系を用いたサンドイッチELISAによる高感度化を計った。

【0028】モノクローナル抗体OM7D3Fのビオチン化
モノクローナル抗体OM7D3FをPBSで十分透析後、その2mgに対し、1mg/mlの Sulfo-NHS-LC-ビオチン(商品名: PIERCE社製)水溶液を74μl攪拌しながら少量ずつ加え、室温で30分放置した。これをPBSで十分透析し、ビオチン化モノクローナル抗体 OM7D3Fとした。

【0029】(2) サンドイッチELISA

モノクローナル抗体 OM10D3F、OM6H11D、OM7D3Fの5μg/ml PBS溶液50μlをそれぞれELISAプレートに固相化したのち、実施例1の(4)同様プロッキングした。各ウェルに未変性あるいは熱変性オボムコイド0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000ng/ml Tween 20-TBS溶液を50μlずつ添加し、37°Cで1時間放置した。洗浄後、各ウェルに2μg/mlのビオチン化モノクローナル抗体OM7D3F Tween 20-TBS溶液を50μlずつ添加し、37°Cで1時間放置した。Tween 20-TBS洗浄後、さらに25ng/mlのアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビシン(Oncogene Science社) Tween 20-TBS溶液を50μlずつ添加し、37°Cで1時間放置した。このプレートはその後実施例1の(4)同様に、アルカリホスファターゼ反応に供された。その結果を図5~7に示す。

10

【0030】図5に示されるように、モノクローナル抗体OM10D3Fとビオチン化OM7D3Fの組み合わせにより3-300ng/mlの範囲で未変性オボムコイドのみが、図6に示されるようにモノクローナル抗体 OM6H11Dとビオチン化OM7D3Fの組み合わせにより3-100ng/mlの範囲で熱変性オボムコイドのみがそれぞれほぼ特異的に定量可能である。一方、モノクローナル抗体OM7D3Fとビオチン化OM7D3Fの組み合わせでは、30-1000ng/mlの範囲で未変性オボムコイドと熱変性オボムコイドと同じ感度で定量可能である(図7)。つまり、この系を用いれば総オボムコイドの定量が可能である。なお、モノクローナル抗体OM7D3Fはオボムコイドの糖鎖認識抗体である事が判明している。このことが、通常同じモノクローナル抗体同士のサンドイッチELISAは成立しないにもかかわらずモノクローナル抗体OM7D3Fでは成立すること、モノクローナル抗体OM7D3Fが加熱、非加熱オボムコイドを同等に認識する事を可能にしている。

【0031】実施例4

20 オボムコイドの加熱変性過程の追跡(図8)

実施例3で確認された3種のサンドイッチELISAの応用例としてオボムコイドの加熱変性過程の追跡実験を行った。100μg/mlのオボムコイドを100μlずつフタ付チューブ4本に分注し、これを沸騰水の中で0, 10, 20, 30分加熱後氷水で急冷した。各チューブ中の試料を適当に希釈して未知試料とし、実施例3の3種のELISAを行い、未変性オボムコイドは図5の白丸を、熱変性オボムコイドは図6の黒丸を、また総オボムコイドは図7の白丸を検量線として定量した。

30 【0032】実施例5

オボムコイドに特異的に結合するモノクローナル抗体を用いた脱オボムコイドタンパク質の作製

タンパク質の固定化に用いる担体としては種々市販されているが、本実施例ではアフィゲル10(BIO-RAD社)を用いた例を挙げる。また、脱オボムコイド化には、原料として市販のオボアルブミン(Sigma社OVA Grade VI)を用いた例を挙げる。

【0033】(1) モノクローナル抗体の樹脂への固定化
結合緩衝液(0.15M 塩化ナトリウムを含む0.1M炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH8.5)に対して十分透析された3.8mg/mlのモノクローナル抗体OM7D3F 3mlを冷水で洗浄したアフィゲル10の50%懸濁液4mlに加え、室温で2時間、4°Cで一夜転倒混和する。4°C、500rpm、5分間の遠心により結合緩衝液で3回洗浄後、樹脂と等量の1Mエタノールアミン-塩酸緩衝液Buffer、pH8.0を加えて室温で1時間放置した。得られた樹脂をPBSで洗浄した。

【0034】(2) モノクローナル抗体カラムを用いたオボムコイドの除去

上記のように作製したモノクローナル抗体OM7D3Fの固定化樹脂を小カラムに詰め、PBSで平衡化しておく。この

50

カラムにPBSに透析済みの $2\text{mg}/\text{ml}$ のオボアルブミン(Sigma社OVA Grade VI) 1ml を流し、 1ml ずつ分取した。用いた試料と回収試料中のオボムコイド含量を図5に示した検量線を用いて定量した結果、前者ではオボアルブミンに対して 0.44% のオボムコイドが混入していたが、後者ではオボムコイドは全く検知できなかった。また、ウエスタン解析によってもこのように調製したオボアルブミンがオボムコイドを含まないことが証明されている。さらに、市販の抗オボアルブミン抗体のいくつかはオボムコイドにも反応したが、このように調製されたオボアルブミンを用いて作製したラット抗オボアルブミン抗血清はオボムコイドには反応しなかった。

【0035】

【発明の効果】本発明では、主要食物アレルゲンであるオボムコイドをその熱変性状態を考慮して微量高感度に定量可能となり、アレルギー診断、食品・生体中のオボムコイドの評価、食品タンパク質の消化・吸収・体内移行過程の解析など、その成果は臨床及び食品産業のような応用領域のみならず、医学・薬学・農学などの基礎領域に対しても非常に重要な貢献をもたらす。更に、該モ*

10 *ノクローナル抗体は低アレルゲン化を目的とした脱オボムコイドタンパク質の調製法にも応用される。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はモノクローナル抗体OM1H1Aの競合ELISA解析

【図2】図2はモノクローナル抗体OM2H12Dの競合ELISA解析

【図3】図3はモノクローナル抗体OM7D3Fの競合ELISA解析

【図4】図4はモノクローナル抗体OM6H11Dの競合ELISA解析

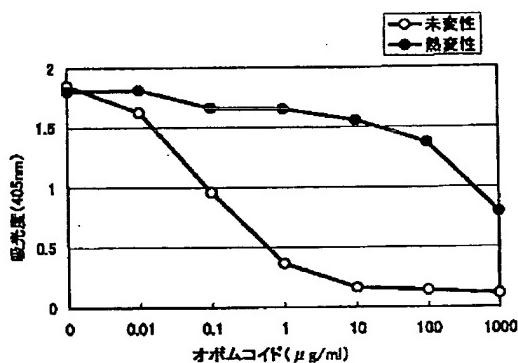
【図5】図5はモノクローナル抗体OM1D3Fとビオチン化OM7D3Fによる未変性オボムコイドの定量系

【図6】図6はモノクローナル抗体 OM6H11Dとビオチン化OM7D3Fによる熱変性オボムコイド定量系

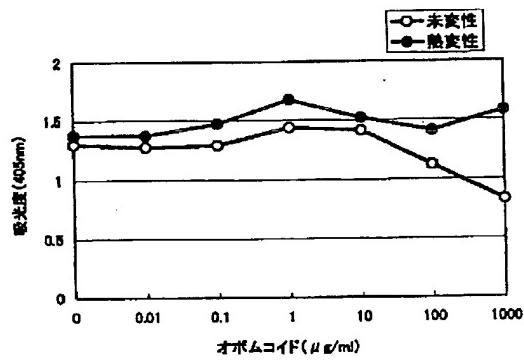
【図7】図7はモノクローナル抗体OM7D3Fとビオチン化OM7D3Fによる熱変性状態の影響を受けないオボムコイドの定量系

【図8】図8オボムコイドの加熱変性過程の追跡

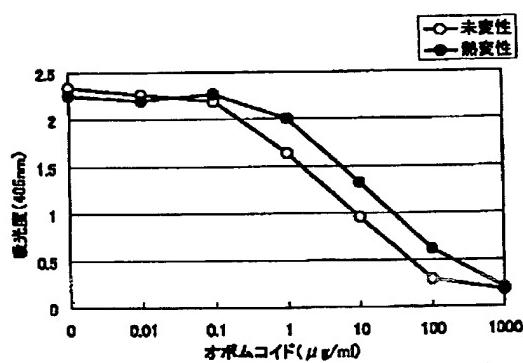
【図1】



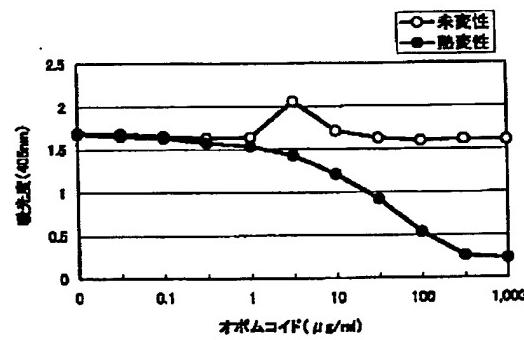
【図2】



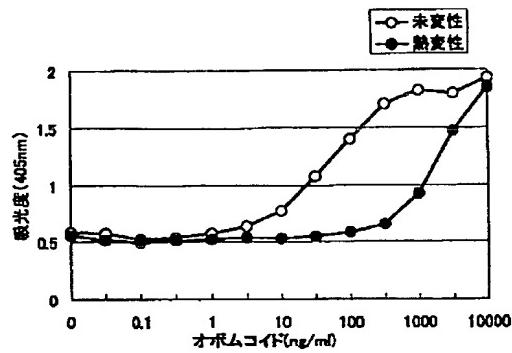
【図3】



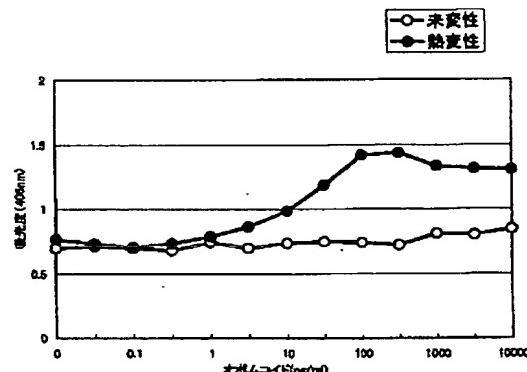
【図4】



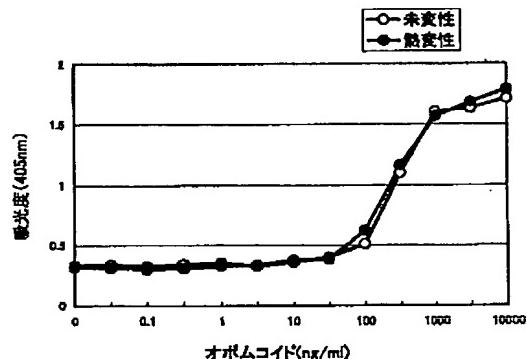
【図5】



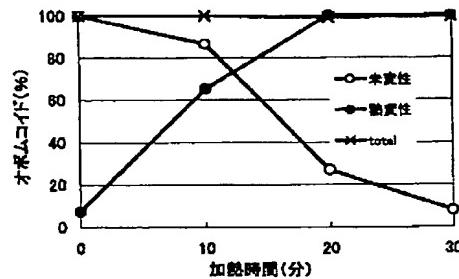
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.7

識別記号

G 01 N 33/53
33/577

F I

C 12 N 15/00
5/00

テーマコード(参考)

C
B

F ターム(参考) 4B024 AA05 AA11 BA53 GA03 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA10
 DA13
 4B065 AA92X AB05 AC14 BA08
 CA25 CA41 CA46
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76
 EA50 EA61 FA72 GA26